

«CONTROL DE LA QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA»

Gustavo C. Zielinski^(1,2); Hernán G. Piscitelli⁽¹⁾

⁽¹⁾Sanidad Animal. Área de Producción Animal. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez.

⁽²⁾ Profesor adjunto. Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Fac. Cs. Veterinarias. Univ. Nacional de Rosario.

gzielinski@mjuarez.inta.gov.ar

1.- INTRODUCCIÓN

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) es una de las enfermedades más prevalentes en los bovinos de la Argentina, causando agudas pérdidas por disminución del crecimiento del ganado en engorde, costos de tratamientos y disminución del valor de venta de los animales con lesiones oculares evidentes (1).

Su agente etiológico es *Moraxella bovis* una bacteria Gram negativa, de morfología diplobacilar, no fermentadora de azúcares, pero que licúa la gelatina como principal característica bioquímica, la que se utiliza para su identificación taxonómica. Entre sus principales atributos de virulencia se encuentran la expresión de pili (llamados también fimbrias), que le permiten adherirse a las células corneales, y la secreción de una citotoxina con actividad de β -hemolisina, con acción deletérea sobre las células blanco (corneales) y leucocitos (1,2). También segrega otros potenciales factores que pueden intervenir en la virulencia bacteriana como fosfolipasas, sistemas de adquisición de Fe^{++} y enzimas proteolíticas e hidrolíticas (1).

Antes de abordar el tema de este informe creemos oportuno realizar una breve descripción actualizada de la patogenia de la enfermedad basada en estos atributos de virulencia a fin de mejor explicar las medidas de control que se expondrán luego.

2.- PATOGENIA

2.1 Principales factores de virulencia de *Moraxella bovis*

2.1.1 Pili

Son estructuras proteicas de la superficie bacteriana compuestos por una unidad con una secuencia amino-terminal altamente conservada de aproximadamente 16-18.000 daltons de peso molecular (3). Se han descrito dos tipos distintos de pili denominados I y Q con pequeñas diferencias del peso molecular que son productos de genes distintos, están compuestos por secuencias de aminoácidos diferentes y comparten aproximadamente el 60%

de sus antígenos. Las cepas de *M. bovis* que expresan pili pueden variar su fase desde un tipo al otro «in vitro» y tal vez «in vivo» (4). Su función consiste en mediar la adherencia de *M. bovis* a las células corneales de tipo oscuro principalmente. Se verificó que las cepas que no expresan pili son apatogénicas.

Debido a su estructura proteica, los pili son inmunogénicos, por lo tanto estimulan la expresión de anticuerpos específicos, característica que fue aprovechada para su clasificación en 7 grupos denominados con letras desde el grupo A a G inclusive (5). **Se ha verificado que ante presión selectiva por anticuerpos o por cambios ambientales o fisiológicos en los tejidos del huésped *M. bovis* puede cambiar la expresión antigénica de los pili, teniendo esto implicancias en la formulación de vacunas con el fin de proteger contra la infección o enfermedad (3).**

Nosotros hemos realizado un estudio preliminar a fin de clasificar dentro del esquema enunciado a los tipos piliares expresados por una colección de aislamientos autóctonos de *M. bovis* obtenidos de brotes de campo de QIB en la Argentina (6). En la tabla 1 se puede apreciar la clasificación que se obtuvo con las cepas estudiadas. En la tabla 2 se puede observar una distribución parcial de serotipos en algunos de los establecimientos muestreados.

Tabla 1.- Agrupación en serotipo pilar de los aislamientos de *M. bovis* estudiados

SEROTIPO							
A	B	C	D	E	F	G	NR*
Mb ⁽¹⁾ 1194 03	Mb1194 142 ⁽²⁾	Mb 1294 44 ⁽²⁾		CMI b	Epp 63	Mb 1194 04 ⁽¹⁾	Mb 1294 175 ⁽³⁾
LCT 2 ⁽⁴⁾	Jp 6 ⁽⁵⁾	Hr 2 ⁽²⁾			A18 OI	Mb1294 161 ⁽¹⁾	80-4
89-221		416				Ce3A	HRI1b ⁽¹⁾
		55-17				LCT 1 ⁽⁴⁾	LCII 3
						LCT 4 ⁽⁴⁾	Jp6 n ⁽⁵⁾
						CMI 4 ⁽³⁾	5-Buch
						CM4	85E
						4-RAUCH	BB
						85 E109	A7 OD
						A6OD	A16 OD
						B6	A12 OD

Números entre paréntesis corresponde a identificación de establecimientos de pertenencia. NR: no reactores

Tabla 2: Visualización de algunos establecimientos que contenían más de un serotipo de *M. bovis*

Serotipo	Identificación de establecimiento				
	1	2	3	4	5
A	Mb1194 03			LCI 2	
B		Mb1194 142			Jp 6
C		Hr 2 Mb 1294 44			
G	Mb 1194 04		CMI 4	LCI 1 LCI 4	
No reactoras	HRI 1b		Mb 1294 175		Jp6 no hem

Del estudio de las dos tablas anteriores puede concluirse que a partir de una limitada colección de aislamientos de *M. bovis* pudo detectarse una gran variabilidad de serotipos entre los establecimientos chequeados, (Tabla 1), verificándose que en al menos 5 de ellos se detectaban animales con por lo menos 2 serotipos distintos (Tabla 2). Así mismo se detectaron aislamientos no clasificables dentro de los grupos antigénicos piliares preestablecidos, que potencialmente podrían pertenecer a serotipos autóctonos.

La variabilidad genética, aunque no necesariamente debida a la composición pilar, de distintos aislamientos de la Argentina, Brasil y Uruguay fueron estudiados más recientemente (7, 8). En un primer estudio 60 aislamientos argentinos fueron agrupados en 15 subgrupos distintos basados en determinaciones del perfil de fingerprints de DNA, de proteínas de membrana externa y de lipopolisacáridos, evidenciando gran variabilidad genética (7). En otro estudio los autores determinaron que el 63% de un total de 18 aislamientos de *M. bovis* realizados posteriormente a 1990 diferían de las cepas utilizadas en vacunas para la Argentina y Uruguay, sugiriendo que las cepas prevalentes cambiaron durante el periodo estudiado y que estos cambios pudieron haber sido estimulados por la selección inmunológica ejercida por el extenso uso de vacunas a partir de los '80 (8). Esta teoría postulada anteriormente por otros autores, que observaron que el cambio de expresión pilar observado en un ensayo de vacuna pudo haber respondido a la presión inmunológica ejercida por anticuerpos específicos (3).

2.1.2 Citotoxina

Ha sido descrita y estudiada la producción por parte de *M. bovis* de una citotoxina con actividad α -hemolisina de entre 94-97 KD de peso molecular. Esta toxina sería segregada asociada a vesículas de la membrana celular de *M. bovis*, **siendo al parecer rápidamente hidrolizada en este medio por enzimas proteolíticas también producidas por la bacteria y presentes en el**

sobrenadante de los cultivos en medio líquido (9). La citotoxina es de naturaleza proteica e inmunogénica, y probablemente los anticuerpos que generan sean protectivos.

La citada toxina pertenece a la familia de toxinas RTF, siendo similar en su constitución bioquímica y funciones a otras toxinas de la misma familia como las segregadas por ciertas cepas de *E coli*, de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, de *Mannheimia haemolytica*, etc. (1,9) en cuanto a que poseen similar mecanismo de acción produciendo un poro en la membrana de las células blanco, a través del cual se establece un flujo iónico que produce el estallido celular. La citotoxina de *M. bovis* actúa de esta manera sobre células corneales, neutrófilos, linfocitos y otros tipos celulares, produciendo el daño corneal que define a la QIB.

2.1.3 Otros factores de virulencia

Se ha detectado la secreción de fosfolipasa B con acción enzimática sobre fosfolípidos de membrana, que puede resultar en lisis celular. También se ha identificado en sobrenadantes de cultivos de *M. bovis* enzimas hidrolíticas como C4-esterasa, C8-esterasa-lipasa, C 14-lipasa, fosfoamidasa, hyaluronidasa y fosfatasa, enzimas proteolíticas como leucina y valina, aminopeptidasas y gelatinasa, que podrían participar en la producción de úlceras corneales (1).

3.- CONTROL TERAPEUTICO POR MEDIO DE ANTIMICROBIANOS

Esta enfermedad se ha tratado de controlar por los más diversos medios, algunos de los cuales son completamente empíricos, no habiendo encontrado su utilización un debido sustento científico. Ejemplo de esto lo constituye el uso tópico de torundas de gasa embebidas en aceite quemado. Por tanto en esta sección describiremos los métodos clásicos de control medicamentoso por medio de drogas antibióticas, sus vías de aplicación y estrategia.

3.1 Antibióticos más frecuentemente usados

Siendo la QIB una **enfermedad no prevenible** (10) se han usado terapias basadas en la administración de antibióticos desde que se conoce el origen infeccioso de la misma. *Moraxella bovis* es una especie relativamente sensible a la mayoría de los antimicrobianos de uso corriente. En un trabajo que realizamos utilizando una colección de 88 aislamientos de campo de *Moraxella bovis* determinamos que, de los antibióticos probados que pueden observarse en la tabla 3, la casi totalidad de las cepas aisladas fueron totalmente resistentes a la lincomicina y cerca del 85% de los aislamientos fueron solo medianamente sensibles a la eritromicina (11).

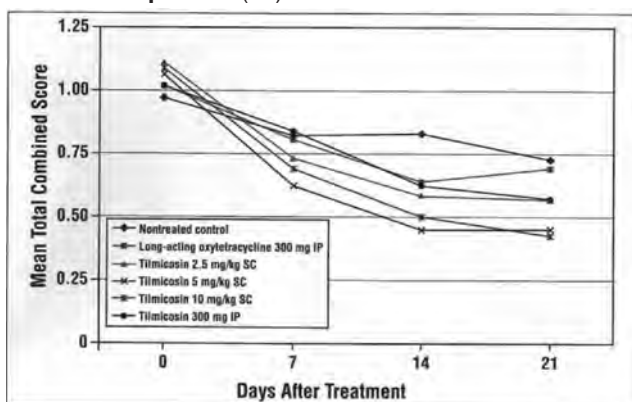
Tabla 3: Sensibilidad a los antibióticos de una colección de 88 aislamientos de *M. bovis* (11)

Antibiótico	Punto de corte		
	Susceptible	Intermedia	Resistente
Enrofloxacin	≤ 0.5 (100) ^a	1	≥ 2
Ceftiofur	≤ 2 (100)	4	≥ 8
Ampicilina	≤ 0.25 - ≤ 8 (100)	0.5-16	≥ 0.5 - ≥ 32
Tilmicosina	≤ 8 (100)	16	≥ 32
Eritromicina	≤ 0.5 (15.9)	1-4 (84.1)	≥ 8
Lincomicina	≤ 0.5	1-2 (2.2)	≥ 4 (97.8)
Gentamicina	≤ 4 (100)	8	≥ 16
Oxytetraciclina	≤ 4 (100)	8	≥ 16
Trim/Sulfamet.	$\leq 2/38$ (100)	-	$\geq 4/76$

^a Cifras entre paréntesis significan porcentajes de aislamientos sobre el total estudiado.

Debe considerarse que la sensibilidad antibiótica de una especie bacteriana «in vitro» no siempre coincide con su susceptibilidad «in vivo», por tanto nosotros probamos la eficacia de alguna de las drogas testeadas en un rodeo de cría compuesto por ganado de raza Hereford en que anualmente se producían brotes de QIB hacia el fin del verano, en el pos-destete. Puede observarse en el gráfico 1 que la administración de **tilmicosina** subcutánea (SC) a razón de 5 ó 10 mg/kg o intrapalpebral (IP) a una dosis total de 300 mg, produjo a los 21 días post-tratamiento un reducción de las lesiones corneales de QIB significativamente superior a la lograda por la administración de 300 mg de oxitetraciclina LA (IP) o a la observada en un grupo control no medicado (12).

Gráfico 1: Evolución de los scores lesionales en distintos tratamientos de un rodeo bovino afectado por QIB (12)



Existen otras comunicaciones sobre la eficacia de distintas drogas para el tratamiento de la QIB.

En un trabajo donde se utilizó el **ceftiofur cristalino** libre de ácido, de larga acción, se informa que una inyección única de la droga en el tejido subcutáneo de la región posterior de la oreja de bovinos de carne entre 3 y 9 meses de vida, tuvo un efecto positivo en la resolución de lesiones de QIB en un brote de infección natural (13). En otro informe se verifica que una inyección única SC de **tulathromicina** tuvo un efecto positivo en la resolución de lesiones de la enfermedad en un lote de terneros de entre 5-6 meses de vida inoculados experimentalmente con *M. bovis* (14).

La **oxitetraciclina de larga acción** es una droga muy utilizada para el tratamiento de brotes de QIB, habiéndose comprobado que su administración precoz, al iniciarse las lesiones corneales, a una dosis de 20 mg/kg PV intramuscular, fue útil para controlar la evolución de las mismas y producir la cura bacteriológica de los ojos afectados (35). También fue probada la eficacia de la administración IP de oxitetraciclina de larga acción *versus* la aplicación intramuscular (IM) de la misma droga en terneros de 4-5 meses de vida enfermos naturalmente de QIB. Los autores informaron que no hubo diferencias en la tasa de mejoría entre los dos tratamientos, en que los terneros afectados moderadamente resolvieron sus lesiones aproximadamente 10 días luego del tratamiento *versus* 17 días que demoraron los animales severamente afectados. Obviamente determinaron que los inyectados IP requerían sensiblemente menor cantidad de droga que los inoculados IM para lograr el mismo efecto (281 *versus* 2033 mg para los afectados moderadamente; 1156 *versus* 3982 mg para los afectados severamente) (15). Existen también reportes más antiguos que afirman que la **cloxacilina benzatínica**, aplicada por única vez o repetida a las 72 horas en forma tópica en base oleosa fue eficaz para reducir y cicatrizar lesiones de QIB en terneros afectados (16).

3.2.- Vías de aplicación

Básicamente existen dos vías de aplicación de los antimicrobianos para el control de la QIB: la **vía sistémica** que puede ser: subcutánea (SC) o intramuscular (IM), y la **vía local** que puede ser intrapalpebral (subconjuntival)(IP) o tópica. A fin de encarar el tratamiento de un brote de QIB la elección de las drogas, vías de aplicación y estrategia de administración al rodeo dependerá de distintas variables: cantidad total de animales en el rodeo afectado, instalaciones, prevalencia e incidencia de la enfermedad en el rodeo, costos de las drogas a utilizar, disponibilidad de mano de obra.

Históricamente la **vía local** tópica fue la más utilizada para el tratamiento de animales afectados debido a la facilidad de aplicación de los productos terapéuticos. Sin embargo la principal limitante que posee es que la permanencia de los compuestos medicamentosos activos depende del excipiente en que se encuentren diluidos. Así, los antimicrobianos suspendidos

en solución acuosa tienen una muy corta vida útil a nivel de las lágrimas y son fácilmente barridos por las mismas, y aunque alcancen momentáneamente en estas secreciones una alta concentración que supere la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), no serán efectivos para el control de las lesiones de QIB. Debido a esto se hace necesaria la aplicación de estos productos entre 3 a 4 veces por día por 4 a 7 días (16). Sin embargo se han desarrollado productos que diluyen los antibióticos (penicilina procaínica y penicilina benzatínica) en base oleosa o en ungüentos y que han probado mantener concentraciones terapéuticas en el saco conjuntival por 37 y 56 horas, respectivamente (16).

Existen pocos trabajos que realicen la comparación de la acción terapéutica de la vía de administración local *versus* la vía sistémica; sin embargo se ha reportado que dos administraciones tópicas de **cloxacilina benzatínica** en base oleosa (375 mg) tuvieron el mismo efecto en reducir las lesiones de QIB que dos inyecciones IM de oxitetraciclina LA (20 mg/kg), teniendo la misma capacidad para eliminar *M. bovis* en muestreos posteriores al tratamiento (17).

Dentro de las **vías locales** de aplicación de antibióticos para el tratamiento de la QIB, la **vía intrapalpebral** (IP) no es muy utilizada; sin embargo es muy eficiente en términos de lograr altas concentraciones oculares de las drogas administradas y reducir los costos por tratamiento. Esta vía probablemente lleva a una difusión directa de las drogas hacia las membranas coroides y esclerótica, y si se llegase a derramar parte del inóculo probablemente ingresaría en el film lagrimal y eventualmente en el ojo por vía de la cornea como si hubiese sido aplicada tópicamente (16). Las drogas que se pueden inyectar en forma IP en el párpado superior pueden ser del grupo de las tetraciclinas. Si se inocula oxitetraciclina larga acción (LA) se producirá una reacción dérmica que podría producir un cierto grado de necrosis en el sitio de inoculación. Si la necrosis no es severa, la reacción que produce es benéfica ya que contribuye a cerrar el ojo impidiendo la acción de irritantes predisponentes a la infección, como polvo ambiental, luz UV, malezas, etc. En el trabajo citado anteriormente (12) observamos que la tilmicosina inoculada a razón de 300 mg totales IP producía similar reducción de lesiones que la inyección de 2,5 mg/kg SC y mejor efecto que la administración de 300 mg totales de oxitetraciclina LA. También se ha reportado el uso de inyecciones IP de penicilina procaínica a razón de 3×10^5 UI con una concentración en lágrimas que superaba la CIM por 35 horas (16).

En otro informe se afirma que la inyección IP de 2 dosis de penicilina procaínica (3×10^5 UI) con 48 a 72 horas de intervalo tuvo similar eficacia en la curación de ulceraciones corneales que la administración IM de 2 dosis de oxitetraciclina LA (20 mg/kg) con un intervalo de 72 horas en forma conjunta con la administración oral de 1g oxitetraciclina/450 gr de pellets de alfalfa. La dosis por animal fue de 2 gr oxitetraciclina/250 kg PV por 10 días. Este último esquema disminuía la prevalencia y prevenía la recurrencia de lesiones corneales (18).

Las **vías sistémicas SC e IM** son muy efectivas en disminuir la infección por *M. bovis* localizadas en las glándulas lagrimales y en la mucosa nasal. Las drogas administradas por esta vía pueden entrar a las estructuras oculares vía el film lagrimal o a través de la circulación perilimbal o intraocular, siendo los compuestos lipofílicos los que mayor concentración alcanzan (16).

Entre las drogas de elección para el uso de esta vía se encuentran la oxitetraciclina LA (20 mg/kg), que alcanza y mantiene concentraciones terapéuticas en glándulas lagrimales, córnea y conjuntiva hasta 72 horas post inoculación. El florfenicol también fue considerado como una droga útil para el tratamiento de la QIB utilizado SC en una dosis de 40mg/kg o IM en dos dosis con 48 hs de intervalo a razón de 20mg/kg (16). La tilmicosina también reveló ser un antibiotico muy efectivo en reducir lesiones de QIB a razón de 5-10 mg/kg (12).

En general esta vía es muy apta para la aplicación de las drogas que se mencionan en el ítem 3.1 y no presenta diferencias en la acción terapéutica con respecto a la vía IP, además de ser fácilmente administrables a través de una inyección SC o IM. Sin embargo tiene el inconveniente que al ser una inoculación sistémica la dosis a administrar para que se obtengan concentraciones oculares que superen a la CIM debe ser mucho más elevada que la utilizable en vías de administración IP.

Se acepta que el tratamiento de casos clínicos de QIB con antibióticos es efectivo para reducir el tiempo de cicatrización de lesiones corneales asociadas a la misma. Sin embargo, en un estudio epidemiológico que evalúa todas las comunicaciones sobre eficacia terapéutica de distintas drogas contra QIB, los autores concluyen que no existen evidencias de que este tratamiento produzca diferencias en las ganancias de peso diarias entre grupos tratados y controles, en experiencias con infección natural estadísticamente validadas (19).

3.3 Estrategias de aplicación de antibióticos

Si bien existe abundante material publicado sobre sensibilidad antibiótica de distintas drogas contra *Moraxella bovis*, incluyendo informes sobre eficacia terapéutica de las mismas, no existe mucha información sobre la estrategia de aplicación de las mismas en los distintos sistemas productivos bovinos, ni en las distintas condiciones epidemiológicas de la enfermedad en estos sistemas.

La recomendación clásica para tratar terapéuticamente a animales afectados con QIB es **apartarlos del rodeo, tratarlos con la dosificación y frecuencia indicada de la droga de elección y reinsertarlos en su medio luego de la finalización del mismo**. Este esquema, si bien correcto desde el punto de vista médico, puede no ser el ideal desde el aspecto económico y de manejo del rodeo afectado con un brote de la enfermedad, dependiendo su adecuación al tipo de explotación.

Debe recordarse que: 1) los casos de terneros afectados por QIB se producen a lo largo de todo el verano; 2) existen portadores sanos que pueden eliminar el agente, contaminar los vectores (moscas), y estos a su vez infectar animales susceptibles. Hemos comprobado que la mucosa nasal es un hábitat donde *M. bovis* puede encontrarse y sobrevivir, pudiendo ser un lugar desde donde parten las infecciones que luego se hacen clínicas (20); y 3) pueden existir múltiples serotipos de *M. bovis* en el mismo rodeo; ello podría explicar las infecciones intercurrentes en un mismo animal, cuya generación de inmunidad adquirida post-infección puede ser dirigida contra uno de ellos, conservando intacta la susceptibilidad contra otro (6).

Estas cuestiones hacen que, de adoptarse el esquema de tratamiento descrito anteriormente en brotes en rodeos de cría con gran número de animales, el trabajo de apartar los mismos, tratarlos, volverlos al rodeo, apartar un nuevo grupo de afectados (que se hallaban en el periodo prepatente subclínico de la enfermedad cuando se apartó el primer grupo), tratarlos, volverlos al rodeo, y así sucesivamente, consumiría un gran tiempo y esfuerzo por parte de los productores, que pasarían gran parte de la época de mayor incidencia ocupados en controlar el brote.

Ha sido informado que el tratamiento de todo el rodeo con oxitetraciclina LA IM, seguido del suministro diario de oxitetraciclina oral 2gr/250 kg PV por 10 días, reduce la incidencia de la QIB al 3% dentro de la estación estival (16). Sin ser la droga de elección la determinante del esquema, se ha informado en la misma publicación que la administración de drogas a todos los animales simultáneamente sería efectiva en reducir la incidencia de la QIB (16). Ello podría explicarse teniendo en cuenta que cuando aparecen animales afectados, concebiblemente hay otros infectados en periodo prepatente que van a seguir uno de dos caminos: 1) se convierten en portadores-diseminadores subclínicos de la infección, o 2) la infección se vuelve clínica y desarrolla las lesiones típicas de la enfermedad, por lo que va a ser necesario tratarlos médicamente. Sin embargo, **si se administra el antibiótico en forma simultánea a todos los animales, lesionados o no, concebiblemente se reduce el número de infectados prepatentes, que no siguen la evolución descrita, consiguiéndose disminuir entonces la presión de infección de *M. bovis* sobre el rodeo** y por tanto disminuir la incidencia de los brotes en la estación estival. Con ello podríamos tal vez espaciar la cantidad de tratamientos durante la estación, con el consiguiente ahorro de trabajo fundamentalmente en el movimiento de animales. Obviamente la vía de aplicación IP sería la ideal para esta estrategia, debido al menor requerimiento de droga que se necesitaría, con respecto a las vías sistémicas. Las medicaciones tópicas también podrían ser aptas, siempre y cuando la permanencia del principio activo en los tejidos oculares fuese la mínima necesaria. Un problema a resolver sería la generación de resistencia ante la dosificación masiva de animales; sin embargo, la gran susceptibilidad de *M. bovis* contra casi todos los tipos de drogas podría disminuir este problema potencial. Esta estrategia podría adoptarse en los rodeos cuando se verifique que la incidencia de los brotes va en aumento, esto es por ejemplo cuando

alcance al 2-5% del rodeo con tendencia a aumentar. En caso de observarse una baja proporción (0.5-1%) de animales afectados, tal vez no se justificaría la adopción de esta estrategia sino la terapéutica individual de los mismos.

El esquema de tratamiento metafiláctico propuesto no necesariamente se adapte para todos los tipos de explotación. Para aquellas en que el acceso a los animales sea fácil, o el número de animales sea muy limitado, es técnicamente aconsejable la estrategia medicamentosa convencional de apartar, medicar, curar y reponer.

El **control de vectores** como la «mosca de la cara» podría ser fundamental en los brotes estivales con una gran población de los mismos, aunque en condiciones de pastoreo sea un objetivo de difícil cumplimiento. Además no explica los brotes invernales de QIB donde la población de vectores es mínima.

4.- CONTROL PREVENTIVO: UTILIZACIÓN DE INMUNÓGENOS ESPECIFICOS

Desde los años '70 luego de que se estableciera el rol de *Moraxella bovis* como agente de la QIB se han desarrollado distintos inmunógenos con el fin de prevenir la enfermedad. En nuestro país existen un limitado número de publicaciones relativas al tema.

En un experimento en dos establecimientos pecuarios realizado luego de que estén disponible en el mercado vacunas con *Moraxella bovis* en fase piliada, el autor reportó una buena protección conferida por las mismas con diferencias significativas entre los grupos vacunados y no vacunados (21). Sin embargo otros autores utilizando la misma bacterina encontraron que los niveles de protección conferidos a los grupos vacunados eran bajos (19,6%), razón por la cual sugirieron que la inclusión de cepas regionales podría ser una estrategia de utilidad para incrementarlo (22). Nosotros realizamos posteriormente un ensayo utilizando dos marcas comerciales distintas de bacterinas piliadas contra *Moraxella bovis* en un establecimiento de cría de ciclo completo donde se registraban anualmente brotes de queratoconjuntivitis. Las primeras lesiones comenzaron a aparecer a los 28 días post inoculación y se prolongaron en los tres grupos (dos vacunados y un testigo sin vacunar) hasta los 113 días post inoculación en que se concluyó el ensayo sin haberse detectado diferencias entre los grupos (23). En otro ensayo (Zielinski & Piscitelli, no publicado, 1998) tampoco pudimos detectar diferencias entre grupos vacunados y testigo sin vacunar cuando evaluamos una bacterina piliada en un rodeo Hereford de un establecimiento de cría de ciclo completo cuando se produjo el brote severo de QIB. Tabla 4.

Tabla 4: Evaluación de eficacia de una bacterina piliada contra la QIB en un rodeo Hereford con infección recurrente durante la época estival

	Inoculación (17-12-98)		1ra observ (20dpi*)		2da observ (56 dpi)		3ra observ (92dpi)		4ta observ (132dpi)	
	% afec	Grado lesión	% afec	Grado lesión	% afec	Grado lesión	% afec	Grado lesión	% afec	Grado lesión
Vacun. (n=50)	0	0	12,5 ^a	1	2,3	1	2,3 ^a	3	29 ^a	2
No vacun (n=50).	0	0	31 ^b	1,05	5,2	1	17 ^b	1,1	34 ^a	1,3

* Dias post inoculación

-Distintos superscriptos significan diferencias estadísticas

Luego de esta generación de vacunas piliadas se probaron a nivel internacional diversos desarrollos. En uno de ellos se ensayó una preparación de hemolisina libre de células inactivada por formol y adyuvantada por adyuvante incompleto de Freund, junto a otra preparación consistente en antígenos pilares sintetizados por expresión de plásmidos en vectores que codificaban la proteína pilar. Los resultados fueron no concluyentes en cuanto al nivel de protección conferida por las mismas (24). En otro trabajo autores australianos ensayaron la actividad protectora de pili en vacunas monovalentes y multivalentes contra la infección experimental por *M. bovis*. Uno de los grupos desafiados por una vacuna monovalente fue protegido en el 100%, pero en otro encontraron sólo el 25% de protección, aislando organismos de un serogrupo pilar heterólogo al del desafío. Concluyeron que ante la presión de anticuerpos homólogos, los organismos cambiaron su expresión pilar disminuyendo significativamente el efecto protector de la vacuna experimental (25).

Con el fin de obviar el problema de la **variabilidad antigénica** representada por la composición de los pili, se preparó y llevó a cabo un ensayo en base a una bacterina autógena. Se la inoculó por vía SC o IP a fin de comparar también las vías de aplicación, en vistas a estimular una respuesta local de mucosas mediante la segunda vía. Los autores informaron que no hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos vacunados por cada vía con respecto al grupo control no vacunado (26).

Utilizando otra estrategia de presentación de antígenos, autores norteamericanos informaron los resultados de una vacuna experimental contra *M. bovis* basada en la administración de citotoxina recombinante adyuvantada con ISCOMS («Immune stimulating complexes») por vía subcutánea. Informaron que existieron diferencias a favor en la protección conferida por la vacuna experimental *versus* los grupos testigo inoculados sólo con ISCOMS o con solución salina; sin embargo el **50% de los animales en el grupo vacunado sufrieron úlceras corneales, evidencia de que la protección fue parcial**. Los

autores sugirieron que la administración por alguna vía que estimule una respuesta de inmunidad local de mucosas podría aumentar la protección (27).

Dos artículos del mismo grupo de investigación informan los resultados de vacunas experimentales contra QIB, basados el primero en la administración de una preparación enriquecida de citotoxina de *M. bovis* adyuvantada con Quil A (28), y el segundo en la inoculación de una vacuna en base a pili y citotoxinas recombinantes de *M. bovis* adyuvantada con ISCOMS (29). En ambos estudios se evidencia una cierta tendencia a mayor protección frente a la infección natural en los grupos vacunados *versus* los grupos placebo, **pero ninguno de los productos evidenciaron una eficacia considerable como para que sean considerados promisorios en tal efecto.** En el último trabajo los autores sugirieron que el desarrollo futuro de vacunas debiera incorporar pili y citotoxinas con adyuvantes que aumenten la producción local de **IgA a nivel lagrimal**, como así también la inclusión de antígenos no relacionados con *M. bovis*, que pudieran tener algún rol patogénico en la enfermedad, como la recientemente descrita *Moraxella bovoculi* (29).

A este respecto, muy recientemente, ha sido publicado un estudio que afirma que bacterinas autógenas elaboradas con *Moraxella bovoculi* o *Moraxella ovis* fallaron en producir protección en bovinos afectados naturalmente por QIB (30).

Los principales esfuerzos para obtener antígenos de *Moraxella bovis* capaces de estimular una respuesta inmune protectora han sido dirigido hacia las estructuras de adherencia-pili- y las citotoxinas, sin embargo, *M. bovis* posee otros atributos de virulencia como proteasas, fibrinolisin, fosfolipasas, y otros compuestos de superficie que son antígenos potencialmente conservados y que presentados correctamente ante el sistema inmune podrían estimular una respuesta protectora. No obstante el potencial de diversidad antigénica de *M. bovis* que es muy elevado, y la conversión de epitopes requieren una vigilancia epidemiológica continuada de los aislamientos a partir de los brotes naturales. Estos conceptos indujeron a autores australianos a afirmar que investigaciones sobre inmunógenos conservados de la especie en caso de hallarse alguno protector, junto a medidas apropiadas de manejo de la enfermedad usadas al mismo tiempo, podrían potencialmente controlar, si no prevenir, la aparición de brotes de QIB (31).

En un reciente estudio epidemiológico evaluando la calidad científica de los artículos publicados desde el año 1960 a 2005 informando resultados de pruebas de evaluación de vacunas contra QIB, los autores encontraron que sólo el 20% de los estudios que utilizaban métodos de distribución al azar y controles ciegos del resultado (utilizados como índices de calidad) informaron resultados a favor de la vacuna, mientras que de los que no informaban suficiente metodología de control (baja calidad científica), el 43% de los artículos publicados reportaron resultados favorables (32), evidenciando que: 1) los informes de menor calidad científica tendían a mostrar mejores resultados de

las vacunas experimentales; y 2) existe una tendencia que evidencia la baja protección que ofrecen las vacunas contra la QIB.

En nuestro laboratorio intentamos desarrollar una bacterina contra *M. bovis* para lo cual realizamos experimentos preliminares cuyo objetivo específico era medir la respuesta inmune local en términos de secreción de IgA de diversas preparaciones antigénicas, adyuvantadas con distintos productos e inoculadas por las vías intranasal o intrapalpebral. (33). Tabla 5.

Tabla 5. Composición y vías de administración de bacterinas experimentales contra *M. bovis*

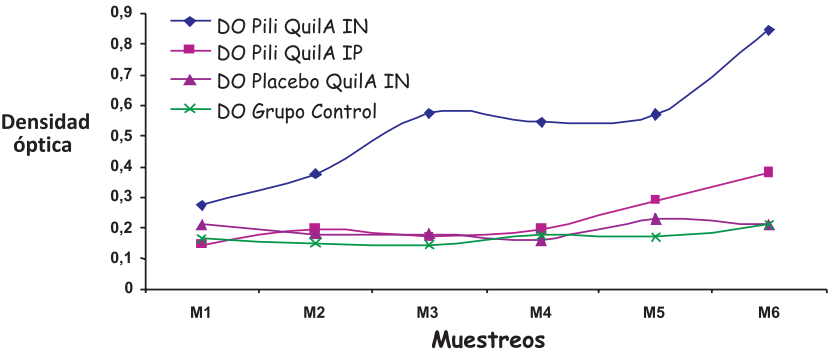
Tratamiento	Antígeno	Adyuvante	Vía de administración
1	Pilis	PLGA*	Intranasal
2	Pilis	PLGA*	Intranasal
3	Pilis	QuilA	Intranasal
4	Pilis	QuilA	Intrapalpebral
5	Pilis	Marcol Arlcel	Intranasal
6	Pilis	Marcol Arlcel	Intrapalpebral
7	Pilis	Marcol Span	Intranasal
8	Pilis	Marcol Span	Intrapalpebral
9	Pilis	PBS+Antibióticos	Intranasal
10	Pilis	PBS+Antibióticos	Intrapalpebral
11	Soma Inactivado	QuilA	Intranasal
12	Soma Inactivado	QuilA	Intrapalpebral
13	Placebo	QuilA	Intranasal
14	Placebo	Marcol Arlcel	Intranasal
15	Placebo	Marcol Span	Intranasal
16	Control	-	-

En este trabajo fuimos capaces de estimular una respuesta en IgA medida a través de una prueba de ELISA específicamente desarrollada, tal como se evidencia en la tabla 6. En la misma, el texto en **negrita** señala aquellos tratamientos en que se obtuvo respuesta significativa de IgA secretoria. En el grafico 2 se evidencia la evolución de la reacción en IgA de los tratamientos que llevaron Quil A como adyuvante.

Tabla 6: Tratamientos ordenados según capacidad de elevar los títulos de anticuerpos.

Tratamientos	Vía de administración
Pili Quil A	Intranasal
Pili Marcol Span	Intranasal
Pili Quil A	Intrapalpebral
Pili Marcol Arlancel	Intranasal
Pili Marcol Span	Intrapalpebral
Pili Marcol Arlancel	Intrapalpebral
Pili PBS y Antibióticos	Intranasal
Pili Microencapsulado 18	Intranasal
Pili PBS y Antibióticos	Intrapalpebral
Soma Quil A	Intranasal
Pili Microencapsulado 17	Intranasal
Placebo Quil A	Intranasal
Control	-
Placebo Marcol Span	Intranasal
Placebo Marcol Arlancel	Intranasal
Soma Quil A	Intrapalpebral

Gráfico 2: DO obtenidas luego de la inoculación con Pilis y Quil A como adyuvante



Si bien el ensayo no fue diseñado para evaluar protección, ya que no se esperaba un brote de QIB debido a que fue realizado en la época invernal donde la prevalencia de infección es normalmente baja y no se desafiaron los animales experimentalmente, a medida que se realizaban los muestreos para obtener la curva de anticuerpos se observaron los ojos de los animales y se

obtuvieron muestras para estudios bacteriológicos. En el gráfico 3 puede observarse la cuantificación de animales observados con lesiones durante la experiencia. En total se utilizaron 80 animales distribuidos al azar en grupo de 5 terneros por tratamiento.

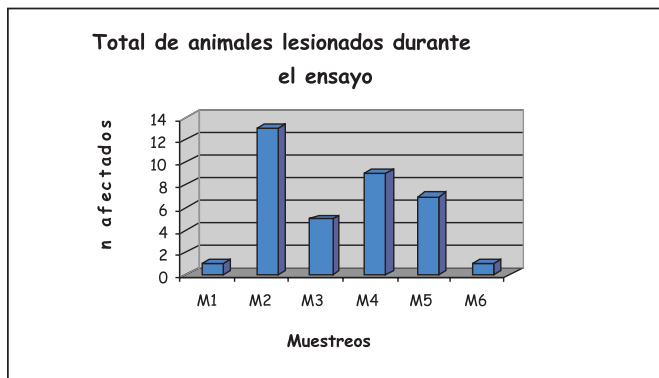


Gráfico 3: detección de animales con lesiones compatibles con QIB durante el ensayo

Puede concluirse a través del estudio de éstos y otros datos que si bien las formulaciones experimentales administradas por vía intrapalpebral e intranasal fueron capaces de estimular una respuesta inmune de mucosas, no lo fueron para proteger a los animales contra la infección (cantidad de aislamientos de *M. bovis* no mostrados), ni contra las lesiones producidas por este agente (u otros asociados) (33).

Lamentablemente es nuestra opinión que las vacunas no son efectivas para proteger a porcentajes significativos de bovinos contra la QIB y no hemos encontrado sólidos trabajos experimentales que demuestren lo contrario. La mayoría de los reportes existentes y citados expresan que los productos experimentales «contribuyen a proteger» u «ofrecen protección parcial» contra la enfermedad. En USA la situación es similar a la que se encuentra nuestro país, en que existen vacunas en el mercado cuyos resultados son inciertos y esporádicamente se utilizan las autovacunas con idénticos resultados (34). Sería necesario mucha más actividad de investigación básica, estudiando la composición antigénica de *Moraxella bovis* a fin de determinar posibles antígenos conservados entre las múltiples variantes de la especie con capacidad para estimular una respuesta inmune protectora. A su vez estos antígenos putativos deberían ser presentados al sistema inmune de tal manera que estimulen una respuesta efectiva a nivel de la mucosa conjuntival, que es una superficie externa expuesta a múltiples factores, tanto biológicos como químicos y físicos que contribuyen a desencadenar los fenómenos patológicos que determinan la aparición de lesiones oculares y que podrían a su vez neutralizar una respuesta inmune protectora.

5.- CONCLUSIONES

- La mayoría de los antibióticos de uso frecuente en Medicina Veterinaria son activos «in vitro» e «in vivo» contra *Moraxella bovis*, contribuyendo su utilización a cicatrizar la lesiones corneales significativamente más rápido que en animales no tratados.
- Es importante la estrategia a adoptar para el tratamiento de brotes de QIB, debiendo tenderse a acotar no sólo las lesiones de los animales afectados clínicamente, sino también el ciclo de infección a través del tratamiento de portadores subclínicos.
- Existen numerosas limitaciones inherentes a: la patogenia de la enfermedad, la variación antigénica del agente causal, los agentes intercurrentes, las condiciones ambientales, la geografía anatómica donde se desarrolla el proceso patológico, entre otros. que hacen que las vacunas actualmente en uso tengan un limitado valor para prevenir la enfermedad.

6.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Postma, GC., Carfagnini JC., Minatel L. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. Comp. Immunol. Micro. Infectious Diseases 31:449-458, 2008.
- 2.- Bretschneider, G., Pérez, SE. Generalidades sobre queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Therios 26(136)206-212, 1997.
- 3.- Atwell JL., Tennent JM., Lepper AWD., Elleman TC. Characterization of pilin genes from seven serologically defined prototype strains of *Moraxella bovis*. J. Bacteriol 176:4875-4882, 1994.
- 4.- Ruehl WW., Marrs CF., George L., Banks SJM., Schoolnik GK. Infection rates, disease frequency, pilin gene rearrangement, and pilin expression in calves inoculated with *Moraxella bovis* pilin-specific isogenic variants. Am. J. Vet. Res. 54(2)248-253, 1993
- 5.- Moore LJ., Lepper AWD. A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. Vet. Micro. 29:75-83, 1991.
- 6.- Zielinski GC., Piscitelli Hg., Terzolo HR., Tennent J. Serotipificación de cepas de *Moraxella bovis* aisladas en la Argentina. Therios 27(144)317-322, 1998.
- 7.- Prieto CI., Aguilar MO., Yantorno OM. Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraespecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina. Vet. Micro. 70:213-223, 1999.
- 8.- Conceição, FR., Dellagostin OA., Paolicchi F., Cobo A., Gil Turnes C. Molecular diversity of *Moraxella bovis* isolated from Brazil, Argentina and Uruguay over a period of three decades. Vet. Journal 167:53-58, 2004.

- 9.- Billson FM., Harbour C., Michalski WP., Tennent JM., Egerton JR., Hodgson JL. Characterization of hemolysin of *Moraxella bovis* using a hemolysis-neutralizing monoclonal antibody. *Inf. Immunity* 68:3469-3474, 2000.
- 10.- Brown MH., Brightman AH., Fenwick BW., Rider MA. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *J. Vet. Int. Med.* 12(4):259-266, 1998.
- 11.- Zielinski GC., Piscitelli HG., Perez-Monti H., Stobbs LA. Antibiotic sensitivity of an Argentine strain collection of *Moraxella bovis*. *Vet. Therapeutics* 1(3):199-204, 2000.
- 12.- Zielinski GC., Piscitelli HG., Perez-Monti H., Stobbs LA., Zimmermann AG. Efficacy of different dosage levels and administration routes of tilmicosin in a natural outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis (Pinkeye). *Vet. Therapeutics* 3(2):196-205, 2002.
- 13.- Dueger EL., George LW., Angelos JJ., Tankersley NS., Luiz KM., Meyer JA., Portis ES., Lucas MJ. Efficacy of a long-acting formulation of ceftiofur crystalline-free acid for the treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am. J. Vet. Research* 65(9):1185-1188, 2004.
- 14.- Lane VM., George LW., Cleaver DM. Efficacy of tulathromycin for treatment of cattle with acute ocular *Moraxella bovis* infections. *JAVMA* 229(4):557-561, 2006.
- 15.- Starke A, Eule C., Meyer H., Winkel C., Verspohl J, Rehage J. Efficacy of intrapalpebral and intramuscular application of oxytetracycline in a natural outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in calves. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 114(6):219-224, 2007.
- 16.- Mc Connel CS., Shum L., House JK. Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. *Australian Vet. Journal* 85(1-2):65-69, 2007.
- 17.- Daigneault J., George LW. Topically applied benzathine cloxacillin for treatment of experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am J. Vet. Research* 51:376-80, 1990
- 18.- Eastman TG., George LW. Hird DW. Combined parenteral and oral administration of oxytetracycline for control of infectious bovine keratoconjunctivitis. *JAVMA* 212:560-563, 1998.
- 19.- O'Connor AM., Wellman NG., Evans RB., Roth DR. A review of randomized clinical trials reporting antibiotic treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis in cattle. *An Health Res. Reviews* 7(1/2):119-127, 2007.
- 20.- Zielinski GC., Piscitelli HG., Urbani LA. Reproducción experimental de queratoconjuntivitis infecciosa bovina en terneros inoculados con *Moraxella bovis* en fase sólida. *Rev. Med. Vet.* 88(2):73-77, 2007.

- 21.- Talamo DE. Brote de queratoconjuntivitis bovina y evaluación de los resultados de la vacunación con cepas piliadas de *Moraxella bovis*. Therios 9(44)317-324, 1987.
- 22.- Paolicchi, F., Casaro AP., Altuna ME., Terzolo HR. Evaluación de una bacterina piliada contra queratoconjuntivitis infecciosa bovina causada por *Moraxella bovis*. Rev. Arg. Prod. Animal 11(2)241-248, 1991.
- 23.- Piscitelli HG., Zielinski GC. Evaluación de una estrategia de control de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Vet. Argentina XIV(133) 179-186, 1997.
- 24.- Billson FM., Hodgson JL., Egerton JR., Lepper AWD., Michalski WP y cols. A haemolytic cell free preparation of *Moraxella bovis* confers protection against Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. FEMS Microbiology Letters 124:69-74, 1994.
- 25.- Lepper AWD, Atwell JL., Lehrbach PR., Schwartzkoff CL., Egerton JR., Tennet JM. The protective efficacy of cloned *Moraxella bovis* pili in monovalent and multivalent vaccine formulations against wxperimentlly induced infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). Vet. Micro. 45:129-138, 1995.
- 26.- Davidson HJ., Stokka GL. A field trial of autogenous *Moraxella bovis* bacterin administered through either subcutaneous or subconjunctival injection on the development of keratoconjunctivitis in a beef herd. Can. Vet. Journal 44:577-580, 2003
- 27.- Angelos JA., Hess JF., George LW. Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. Vaccine 23:537-545, 2004.
- 28.- George LW., Borrowman AJ., Angelos JA. Effectiveness of a cytolisin-enriched vaccine for protection of cattle against infectious bovine keratoconjunctivitis. Am Journal Vet. Res 66:136-142, 2005.
- 29.- Angelos JA, Bonifacio RG., Ball LM., Hess JF. Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* pilin-*Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. Vet. Micro 125:274-283, 2007.
- 30.- Funk L., O'Connor AM., Maroney M., Engelken M., Cooper VL., Kinyon J., Plummer P. A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine kertoconjunctivitis in beef calves. Vaccine 27:4585-4590, 2009.
- 31.- Mc Connel CS., House JK. Infectious bovine keratoconjunctivitis vaccine development. Aust. Vet. J. 83:506-510, 2005.

- 32.- Burns MJ., O'Connor AM. Assessment of methodological quality and sources of variation in the magnitude of vaccine efficacy: A systematic review of studies from 1960 to 2005 reporting immunization with *Moraxella bovis* vaccines in young cattle. *Vaccine* 26:144-152, 2008.
- 33.- Zbrun MV. Estudio de la respuesta inmune local mediada por inmunoglobulina A específica contra *Moraxella bovis* en lagrimas de bovinos inoculados por vías no convencionales con inmunógenos experimentales. Tesis. Maestría en Microbiología Molecular. Univ. Nac. de San Martín- ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán». 2009. En preparación.
- 34.- Angelos JA., O'Connor AM. Comunicación personal, 2009.
- 35.- Odeón AC., Chayer R., Campero CM., Moreira AR., Bretschneider G., Perez SE. Eficacia terapéutica de la oxitetraciclina de larga acción por vía intramuscular en el tratamiento precoz de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB). *Rev. Med. Vet.* 77(1)19-24, 1996.